

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-222788

(43)Date of publication of application : 06.09.1989

(51)Int.Cl.

C12P 7/62
// (C12P 7/62
C12R 1:05)

(21)Application number : 63-049015

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 02.03.1988

(72)Inventor : DOI YOSHIHARU

(54) PRODUCTION OF COPOLYESTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel copolyester containing 3-hydroxybutyrate unit and 4-hydroxybutyrate unit, by making a culture under specified conditions, of microorganisms capable of accumulating polyester.

CONSTITUTION: *Alcaligenes* sp. bacteria e.g., *Alcaligenes eutrophus* H-16. ATCC 17699 capable of producing poly-3-hydroxybutyrate is first put to culture aerobically in a conventional technique at 20W40° C and a pH of 6W10. Thence, the resultant grown bacteria is further put to culture under a limitation of nitrogen and/or phosphorus (pref. in a culture medium or culture solution virtually free from nitrogen and/or phosphorus), in the presence of 1,4-butanediol as the carbon source.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-222788

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成1年(1989)9月6日
C 12 P 7/62
// (C 12 P 7/62
C 12 R 1:05) 6926-4B
審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ポリエステル共重合体の製造方法

⑯ 特 願 昭63-49015

⑰ 出 願 昭63(1988)3月2日

⑱ 発 明 者 土 肥 義 治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39
⑲ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
⑳ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1 発明の名称

ポリエステル共重合体の製造方法

2 特許請求の範囲

- (1) ポリ-γ-ヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス属菌を前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-γ-ヒドロキシブチレートを生成・蓄積させるに際して後段の培養を、γ-ブタンジオールの存在下で行なうことを特徴とするγ-ヒドロキシブチレート単位およびγ-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造方法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、γ-ヒドロキシブチレート単位(以下γHB成分と記す)とγ-ヒドロキシブチレート単位(以下εHB成分と記す)を含有する共重合体の製造法に関し、更に詳しくは、

ポリエステルを蓄積できる微生物を用いて製造されるγHB成分、εHB成分からなる新規の共重合ポリエステルの製造法に関する。

(従来の技術)

ポリ-γ-ヒドロキシブチレート(PHB)は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、PHBは耐衝撃性に劣るとゆう物性上の問題とともに、生産コストが高いことから工業的生産が見送られてきた。

近時、 β HB成分および γ -ヒドロキシバ
レート単位（以下 β HV成分と記す）を含有す
る共重合体およびその製造法について、研究、
開発がなされ、たとえば、特開昭57-150393
号公報および特開昭59-220192号公報にそ
れぞれ記載されている。

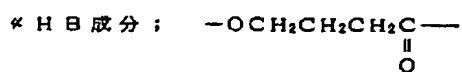
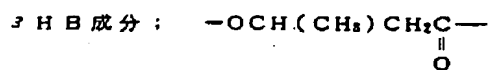
しかしながら、共重合体の β HV 成分が 0 から β モル分まで増大するとこの増大に伴って融解温度 (T_m) が 150°C から 55°C まで急激に低下することが知られており (T. L. Bluhm et al, *Macromolecules*, 19, 2871 (1986))。そのため、 β HV 成分含有率の高い共重合体は耐熱性に劣っていた。

一方、本発明者は、 β -HB成分および α -HB成分を含有する共重合体およびその製造法について研究、開発を行ない、先に出願した（特願昭62-204538）。かかる共重合体は α -HB成分の共重合成分含有率が高い場合でも、高い融点を有することから工業的な価値は高い。しかしながら、この方法では炭素源として高価な

チレート単位からなるポリエステル共重合体の製造方法に存する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、共重合体に含有される γ -HB成分および α -HB成分はそれぞれ次式であらわされる。



本発明で使用する微生物は、PHB生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上は、たとえば、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリゲネス ルーランディイ (*Alcaligenes ruhlandii*)、アルカリゲネス ラタス (*Alcaligenes latus*)、アルカリゲネス アクアマリヌス (*Alcaligenes aquamarinus*) およびアルカリゲネス ユウトロフス (*Alcaligenes eutrophs*) 等のアルカリゲネス属などがある。

試案を使う必要があったため、工業的に容易に入手できる汎用の炭素源を見出すことに対する極めて高い要請があった。

(問題点を解決するための手段)

本発明者は、以上の点を鑑み、 γ -HB成分および ϵ -HB成分からなる共重合体を工業的に有利にかつ容易に製造すべく鋭意検討した結果、後段の鹽素もしくはリンを制限する培養において、 ϵ -ブタンジオールの存在下でPHB生産能を有する微生物を培養するとこの菌体中に所望の共重合体が生成・蓄積されるとの新知見を得て、本発明に到達した。

すなわち本発明は、ポリマーヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス属菌を前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリマーヒドロキシブチレートを生成・蓄積させるに際して、後段の培養を、 γ -ブタンジオールの存在下で行なうことを特徴とするポリマーヒドロキシブチレート単位およびポリマーヒドロキシブ

これらの菌種に属する菌株の代表例として、
アルカリゲネス フェカリス ATCC 8750,
アルカリゲネス ルーランデイイ ATCC 5749,
アルカリゲネス ラタス ATCC 29712, アル
カリゲネス アクアマリヌス ATCC 4400
ならびにアルカリゲネス ユウトロフス H-16
ATCC 17699 およびこの H-16 株の突然
変異株であるアルカリゲネス ユウトロフス
NCIB 11597, 同 NCIB 11598, 同
NCIB 11599, 同 NCIB 11600 などを
挙げるができる。これらのうち、実用上、
アルカリゲネス ユウトロフス H-16 ATCC
17699 およびアルカリゲネス ユウトロフス
NCIB 11599 が特に好ましい。

アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の
菌学的性質は、たとえば、"BERGEY'S
MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERI-
OLOGY: Eighth Edition, The Williams
& Wilkins Company/Baltimore" に、ま
た、アルカリゲネス ユウトロフス H-16 の

菌学的性質は、たとえば、"J. Gen. Microbiol.", 115, 185~192 (1979) にそれぞれ記載されている。

これらの微生物は、従来の方法と同様に、主として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素もしくはりんを制限して菌体内に共重合体を生成蓄積させる後段の培養との二段で培養される。

前段の培養は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を適用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。

培地成分は、使用する微生物が変化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類ならびにソルビトール、マンニトールおよびイノシトールなど、窒素源

としては、たとえば、アンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物ならびに無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、ほう素化合物およびよう素化合物などからそれぞれ選択される。

また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。

培養条件としては、温度は、たとえば、20~40℃程度、好ましくは25~35℃程度とされ、また、pHは、たとえば、6~10程度、好ましくは7.5~9.5程度とされる。このような条件で好氣的に培養する。

これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条

件をはずして培養することを妨げない。

培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

前段の培養によって得られた菌体を、さらに窒素および/またはりん制限条件下で培養する。

すなわち、前段の培養で得られた培養液から微生物の菌体を、濾過および遠心分離のような通常の固液分離手段により分離回収し、この菌体を後段の培養に付するか、または、前段の培養において、窒素および/またはりんを実質的に枯渇させて、菌体を分離回収することなく、この培養液を後段の培養に移行させることによってもできる。

この後段の培養においては、培地または培養液に窒素および/またはりんを実質的に含有させず、ノ、4-ブタンジオールを炭素源として含有させること以外は前段の培養と異なるところはない。

尚、培養液にノ、4-ブタンジオールを含有させる場合は、培養の初期ないし後期のどの時点

でもよいが、培養の初期が好ましい。

本発明に用いられるノ、4-ブタンジオールは、共重合体を生成させることができ、かつ微生物の生育を阻害しないような量であればよく使用した微生物の菌株および所望の共重合割合(モル比)などによって異なるが、一般的には培地もしくは培養液ノ、2に3~40%程度が適当である。

この後段の培養においてはノ、4-ブタンジオールを唯一の炭素源としてもよいが、使用した微生物が変化し得る他の炭素源、たとえば、グルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、乳酸および吉草酸などを共存させることもできる。たとえば、グルコースを使用する場合には、多くてもノ、5%程度とされる。

このように培養して得られた培養液から、濾過および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得、この乾燥菌体から、常法

により、たとえば、クロロホルムのような有機溶剤で生成された共重合体を抽出し、この抽出液に、たとえば、ヘキサンのような貧溶媒を加えて、共重合体を沈澱させる。

本発明の製造法によれば、共重合体中の3HB成分、4HB成分の割合は任意に調節することができる。

〔実施例〕

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1～5及び比較例1～3

アルカリグネス ユウトロフス H/6 (ATCC 17699) を使用して共重合体を製造した。すなわち、

前段培養：

つぎの組成を有する培地で前記の微生物を30℃で24時間培養し、対数増殖期終期の培養液から遠心分離により菌体を分離した。

FeCl ₃	9.7 g
CaCl ₂	7.8 g
NiCl ₂	118.0 mg
CrCl ₂	62.2 mg
CaSO ₄	156.4 mg

を0.1N-HCl / Lに溶解

これらを脱イオン水 / Lに溶解し、pH 7.0に調整した。

菌体の処理：

後段培養で得られた菌体を蒸留水で洗浄し、引続きアセトンで洗浄し、これを減圧乾燥(20℃、0.1mmHg)して乾燥菌体を得た。

共重合体の分離回収：

このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重合体を沈澱させ、この沈澱を回収、乾燥して共重合体を得た。

共重合体の特性：

このようにして得られた共重合体の組成、固有粘度、融解温度および融解熱を、つぎのよう

前段培養用培地の組成

酵母エキス	10 g	ポリペプトン	10 g
肉エキス	5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g

これらを脱イオン水 / Lに溶解し、pH 7.0に調整した。

後段培養：

前段培養で得られた菌体を、つぎの組成を有する培地に、1Lあたり5gの割合で懸濁させ30℃で48時間培養し、得られた培養液から遠心分離により菌体を分離して、菌体を得た。

後段培養用培地の組成

0.5M	りん酸水素カリウム水溶液	39.0 ml
0.5M	りん酸水素二カリウム水溶液	53.6 ml
20wt/V%	硫酸マグネシウム水溶液	1.0 ml

炭素源*

ミネラル溶液** 1.0 ml

* 炭素源として後記表1に記した様々な種類の化合物を用いた。(単位 g/L培地)

** ミネラル溶液

CoCl₂ 119.0 mg

にして測定した。すなわち、

組成：¹H-NMRスペクトルによる。

固有粘度[η]：30℃、クロロホルム中。

測定結果などを第1表に示す。

尚、実施例2で得られた共重合体の500MHz¹H-NMRスペクトルを図1に、125MHz¹³C-NMRスペクトルを図2に各々示した。



表 1

	試 料	乾燥固 体重量 (g)	ポリエス テル含量 (wt%)	組 成 (モル%)			[η] (dl/g)
				3HB	4HB	3HV	
実施例1	1,4-ブタンジオール	2.66	8	75	25	0	1
比較例1	1,3-プロパンジオール	3.70	3	94	0	6	1
比較例2	1,5-ペンタンジオール	3.52	4	95	0	5	1
実施例2	1,4-ブタンジオール 酢酸	3.91	34	83	17	0	2.9
実施例3	1,4-ブタンジオール 酢酸	5.05	52	93	7	0	2.8
実施例4	1,4-ブタンジオール 酢酸	6.20	63	97	3	0	3.6
実施例5	1,4-ブタンジオール 酢酸	4.60	47	99	1	0	2.9
比較例3	酢酸	4.80	51	100	0	0	3.3

〔 発 明 の 効 果 〕

本発明によれば、3HB成分、4HB成分を含有する新規のポリエステル共重合体を容易に得ることができる。

さらに本発明で得られた共重合体は、優れた種々の特性を有しているので、手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また徐放性システムへの利用などの多方面への応用が期待される。

* 図面の簡単な説明

図1は実施例2で得られた共重合体の500 MHz、 ^1H -NMRスペクトルであり、図2は同じく実施例2で得られた共重合体の125 MHz、 ^{13}C -NMRスペクトルである。

出 願 人 三菱化成工業株式会社
代 理 人 弁理士 長谷川 一
ほか1名

図 1

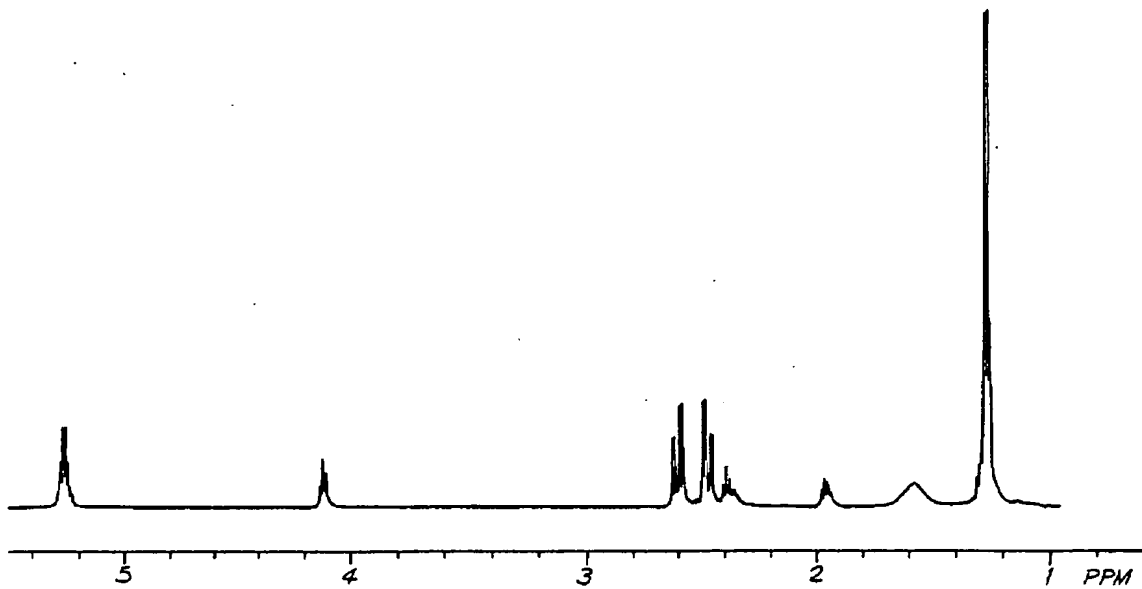
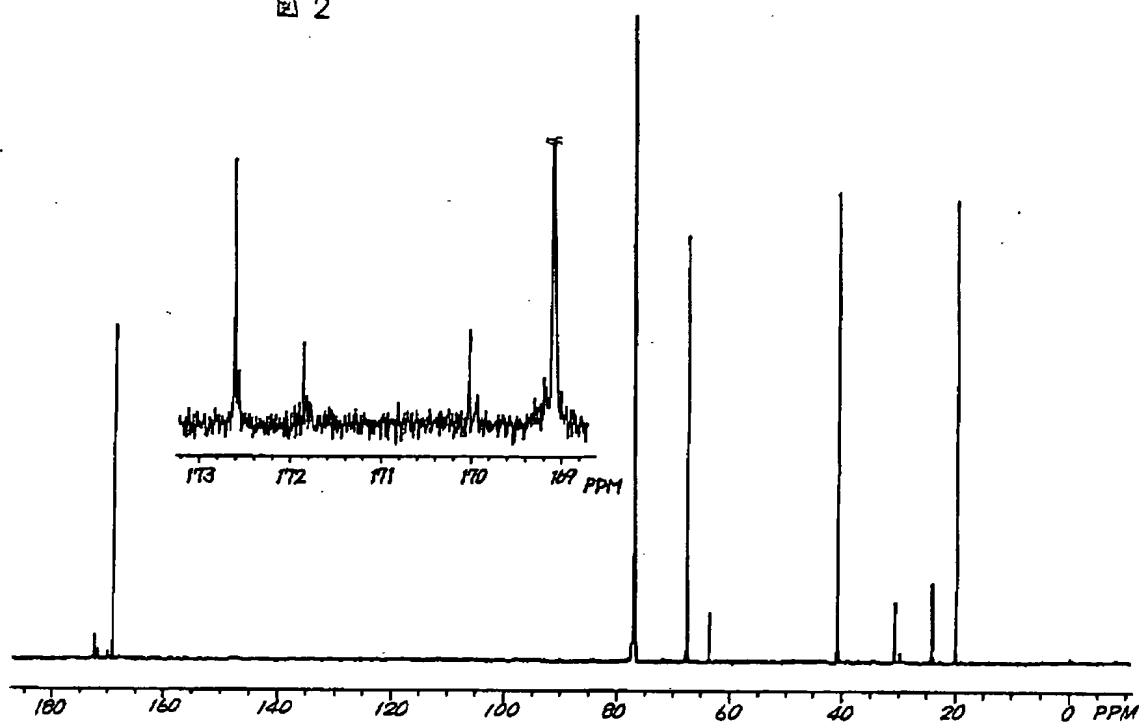


図 2



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**